

Graftın Kök Hücre İçeriğinin Değerlendirilmesi

Serdar Bedii OMAV

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı

GİRİŞ

Otolog periferik kan kök hücre transplantasyonu (OPKKHT) sonrasında hematopoietik engraftmanın hızı ve uzun dönem kalıcılığını belirlemek son derece önemlidir. Çünkü posttransplant morbidite ve mortalite riskleri, transfüzyon ve antibiyotik ihtiyaçları, hastanede kalış süresi ve sonuç ekonomik tablosu engraftmana bağlıdır. Transplant işleminin gerçekten geliştiği 1980 lerin ikinci yarısı ve 1990 ların başında bu öngörünün tek biyolojik parametresi CFU-GM assay özelinde in vitro koloni oluşturma deneyleri idi. Ne yazık ki bu deneyden beklenen avantaj değerlendirebilme öncesi 10-14 gün gerektiği için sorun oluştuyordu. Posttransplant engraftman meydana gelmeden eritilen graft ürünlerinin kaderini kestirebilmek mümkün olamıyordu. Buna ek olarak sadece en gelişmiş ve atanmış öncül hücreler test edilebiliyor ve daha immatür kendini yenileme potansiyeline sahip pluripotent kök hücreler test edilemiyordu. Hematopoiezin uzun dönem yapılanmasından ise ikinci grup hücreler sorumluydu. Fakat CFU-GM kolonileri iki kavramsal olarak farklı elemanı engraftman potansiyeli açısından yansıtırlar: kültürdeki koloni oluşturuvcu hücrelerin hakiki sayısı, koloni oluşturuvcu hücrelerin uyarımını düzenleyen aksesuar hücreler. Bu iki hücre grubundan birinin veya ötekının periferik kan kök hücre toplanmasındaki yetersizliği çok az sayıda CFU-GM kolonilerinin büyümesine yol açar. Muhtemelen bu fenomen birçok araştırcının tahmin edilen CFU-GM graft içeriği ve posttransplant trilineage engraftman arasındaki uyumsuzluktan sorumludur. Farklı laboratuvarlar arasında koloni assay standardizasyonunu yokluğu da farklı gruplar tarafın-

dan rapor edilen başarılı transplantasyon için gerekli CFU-GM eşik dozlarının farklı olmasına yol açmıştır.

1990 ların başında CD34+ hücrelerin mutlak sayılarının belirlenmesi önemli bir gelişme teşkil etmiştir. Bu hücrelerin pluripotent hematopoietik kök hücre alt grubunu kapsadığı gösterilmiştir. Bu sayede flowsitometri ile gerçek zamanlı değerlendirme mümkün olabildi. Önceleri CD34+ flowsitometri deneyi periferik kök hücre toplamasının zamanlaması için bir rehber olarak önerilmiş iken daha sonra graft ürünlerinin hematopoietik potansiyelini değerlendirmek için de yoğun olarak kullanıldı. Birçok araştırcı posttransplant nötrofil ve platelet engraftman hızını belirlemekteki en uygun kriterin graftın CD34+ hücre içeriği olduğunda ısrarlıdır. Ne var ki infüze edilen CD34+ hücre sayısı ile nötrofil engraftmanı arasında doğrusal ilişki nadiren rapor edilebilmiştir; bunun yerine hızlı engraftmanın oluştuğu CD34+ hücre eşik değerleri tanımlanmıştır. Hızlı nötrofil ve platelet engraftmanı için 2×10^6 CD34+ hücre/kg eşik değeri en sık kabul edilen değerdir. CD34 cutt-off değerinin hematopoietik engraftmanın tek göstergesi olarak değeri sınırlıdır, çünkü birçok çalışmada hastaların dikkate değer kısmı düşük CD34+ hücre dozlarına rağmen hızlı ve sürekli engraftmana kavuşmuşlar, bir kısmı da yüksek dozda CD34+ hücreye rağmen gecikmiş engraftman veya engraftman yetmezliği göstermişlerdir. Hem immatür kök hücreler hem de atanmış öncül hücreler CD34 antijenini gösterdiklerinden mobilize olan hücre grubundaki alt gruplar arasında oluşabilecek muhtemel dengesizlikler bu sonuca yol açabilir.

CD34+ CD38- HÜCRELERİN TRİLİNEAGE ENGRAFTMANDAKİ ROLÜ

1998 de Henon ve ark. 45 kanser hastasında transplante edilen mononükleer hücreler(MNC), CFU-GM, total CD34+ hücreler ve bunların CD33 ve CD38 altgrupları ile trilineage engraftman kinetiğini çalıştılar. Hastalığın tipi ve evresine göre tüm hastalar hematopoietik progenitör hücre mobilizasyonu öncesi çeşitli kemoterapi rejimleri almışlardı. Mobilizasyon rejimi her zaman hastalığın tipine göre uyarlanmış bir kemoterapi rejimini kapsıyordu. 45 hastadan 37 si seri halinde rekombinant insan hematopoietik growth faktörleri aldılar. Posttransplant hematopoietik engraftman graft infüzyonundan sonra mutlak nötrofil sayısının 500,1000 ve 2000/mm³ platelet sayılarının ise 20000 ve 50000/mm³ olması, transfüzyon ihtiyacının kalkması ve birbirini takip eden 2 günde mutlak retikülosit sayılarının 30000 ve 50000/mm³ olması ile tanımlandı. Üç farklı istatistik analiz metodu kullanıldı. MNC, CD34+33+ ve CD33- altgrupları ve mutlak nötrofil sayıları(ANC) platelet ve retikülosit sayıları açısından bir bağlantı bulunmadı. İnfüze edilen CFU-GM, total CD34+ ve CD34+38+ hücre sayıları hematopoietik engraftman parametreleri ile düzensiz korelasyon gösterdi. En kuvvetli ve sabit korelasyonlar infüze edilen CD34+38- hücreler ve herbir trilineage engraftman parametresi arasında bulundu. Dolayısı ile bu çalışmada hem kısa hem de uzun dönemli hematopoietik engraftman için en güvenilir öngörü ögesinin graffttaki CD34+38- hücre sayısı olduğu görüldü. Bu çalışmada 5x10⁴ CD34+38- hücre /kg altında engraftman kinetiğinin belirgin şekilde yavaşladığı ve öngörülemediği ortaya çıktı. Aynı araştırmacılar pretransplant TBI hazırlama rejiminin düşük hücre ile yapılan transplantın engraftman kinetiğini geciktirdiğini gösterdi(1).

Wei ve ark. otolog ve allojeneik periferik kan kök hücre lökoferez ürünlerinde CD34+ hücreleri, alt gruplarını ve bu hücrelerin transplantasyon sonrası hematopoietik yapılanma ile ilişkisini araştırdılar. 16 otolog, 24 allojeneik donörde 115 mobilize lökoferez ürünüde flowsitometri ile CD34+ ve CD34+38- hücre oranları ve hematopoietik recovery değerlendirildi. CD34+ hücre oranı otolog ürünlerde daha düşüktü ama CD34+38- hücre oranında farklılık yoktu. Allojeneik ürünlerdeki MNC ler otologlara göre daha fazla idi. Posttransplant nötrofil ve platelet recovery (500/mm³ ve 20000/mm³) açısından benzer ortalama zamanlar gösterdiler. Her iki grupta da MNC sayısı CD34+ ve CD34+38- hücre miktarları ile recovery arasında

ilişki bulundu. Yazarlar otolog veya allojeneik ürün olması ile ilişkisiz, CD34+ ve CD34+38- hücre sayılarının yeniden hematopoietik yapılanmada anahtar olduğu kanaatini ortaya koydular(2).

Son periferik kan kök hücre ürünlerinin klinik kullanım öncesi kalite ve güvenliği son derece önemlidir. CFU-GM ve CD34+ hücre değerlendirmelerinin taze ürünlerde mi, kriyopreservasyon sonrası mı graft içeriğini daha gerçekçi olarak yansıttığı belli değildir. Feugier ve ark. kemik iliği nakline (n=43) ve PKKHT e (n=83) giren hastaların kök hücre ürünlerindeki dondurma öncesi ve eritme sonrası MNC ler, CD34+ hücreler ve CFU-GM seviyelerini değerlendirdiler. Sadece CD34+ hücre sayısı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Eritme öncesi ve sonrası düşük CD34+ hücre sayısı, düşük CD34+ ürünlü grafflarla ilişkili idi ve en yavaş hematolojik recovery bunlarda görüldü. Eritme sonrası PKKHT CD34+ hücre sayısı hazırlama rejiminden önce graftın küçük bir örneğini eriterek değerlendirilebilir. Yazarlar sonuç olarak düşük engraftman riski olan hastalarda özellikle eritme sonrası üründeki CD34+ hücre sayısını değerlendirmeyi önermektedirler(3).

Pratt ve ark. 86 periferik kan kök hücre transplantasyonu hastasında kök hücre içeriğini CD34+ hücre alt gruplarını çalışarak belirlemeye gayret ettiler. CD34+ L-selektin + CD38- hücre sayısı en iyi engraftman hızını belirledi. Sadece CD34+Thy-1+ hücreler kalıcı engraftman ile korelasyon gösterdi. Yeterli 3 aylık engraftman ihtimali transplante edilen CD34+ hücre sayısı ile artış gösterdi. 2.5x10⁵/kg üzerinde CD34+Thy-1+ hücre alan hastalar 3 ay sonrasında da kalıcı engraftmana sahiptiler. Yazarlar ayrıca CD34+Thy-1+ progenitörlerin kinetiğinin total CD34+ hücre kinetiği ile paralellik gösterdiğini ortaya koydular(4).

Sumikuma ve ark. üründeki CD34+ hücre alt gruplarının PBSCT sonrası geç dönem hematopoietik engraftman devamlılığı ile ilişkisini araştırdılar. Hematolojik ve solid maligniteli 25 hastada total CD34+ hücre sayısı ve CD34+90+, CD34+AC133+ hücre sayıları 3, 6 ve 9. aydaki platelet sayıları ile korelasyon gösterdi. Fakat CD34+90+ hücre sayısı PBSCT sonrası 12. ayda en anlamlı ilişkiye sahipti. CD34+AC133+ hücre dozu 3.aydaki WBC sayıları ile korelasyon gösterdi. 80x10⁴ CD34+90+ hücre /kg dan daha fazla alan hastalar PBSCT sonrası tüm zamanlarda 100000/mm³ üzeri platelet sayısına sahiptiler. Yazarlar bu çalışmada CD34+90+ hücre değerinin kalıcı hematopoietik engraftman için eşik doz olduğunu iddia ettiler (5).

Dondurulmuş kök hücrelerin engraftman po-

tansiyelini ve bununla ilişkili *in-vitro* hematopoiez fonksiyonel deneyleri ilgi çekmiştir. Bu deneylerin en fazla kullanılanı 14 günlük CFU-GM'dir. Bu deney nispeten olgun öncül hücreleri temsil eder, fakat araştırmacıların çoğu kemik iliği için son üründe $0.1-1 \times 10^4$ /kg (Gorin, 1986) periferik kan kök hücreleri için 50×10^4 /kg (Gianni 1989) amaçlamışlardır. Maalesef bu deneyin standardizasyonu sorundur ve farklı laboratuvarlar arasında aynı örnek farklı sonuçlara yol açabilir. Yine birçok veri farmakolojik ajanlarla purging yapıldıktan sonra hemen hiç CFU-GM oluşmazken bile yeterli engraftman olduğunu göstermiştir (Santos ve Collin, 1986). Ayrıca aynı laboratuvar da bile zaman içerisinde deney ve kültür şartlarındaki gelişmelerin fonksiyonel deneylerin değerlendirilmesini zorlaştıracığı açıktır. CFU-GMM veya CFU-Mix ve LTC-IC (Long term Initiating Cell Culture) in daha primitif öncül hücreleri temsil edebileceği ve daha güvenilir olduğu iddia edilmekle beraber rutin pratikte kök hücre içeriğinin engraftman potansiyelini sayısallaştırmada yetersiz kalmışlardır. Bu deneyler eziyetli, zaman alıcı ve çalışmacıya bağımlıdır. Ayrıca ürün elde edildiğinde gerçek zaman değerlendirilmesi imkanına sahip değildir. Özellikle periferik kan kök hücre toplamalarında daha da yetersiz kalmaktadır (6).

Kemik iliği hücrelerinin LTC'leri erken progenitörler, stroma ve düzenleyici faktörlerin etkileşimlerini çalışmak için hematopoiezin *in-vitro* modeli olarak sıklıkla kullanılmışlardır. Farklı stroma katmanları LTC deneylerinde kullanılmış ve stroma besleyicisinin (stromal feeder) LTC-CFC (long-term culture colony forming cells)'lerin idamesi ve sıklığını etkilediği gösterilmiştir. Stromaya bağlı LTC deneyleri primitif kök hücrelerin deposu olarak stromaya bağlanan katmanın ve bu hücreler arasında temas olmasının kök hücre çoğalma ve farklılaşması için şart olduğunu gösterdi. Fakat kök hücre içeriğinin değerlendirilmesinde standart bir yöntem olarak ortaya çıkamadı. Lanza ve ark. CD34+ hücre alt gruplarının CFC ve LTC-CFC deneyleri ile otolog periferik kök hücre naklindeki engraftman potansiyelini araştırdılar. 34 hastalık bu önemli çalışmada sırayla şu sonuçlara varıldı. Hematolojik maligniteli periferik hasta ürünleri normal kemik iliğine göre daha düşük CFU-F insidansı, daha yavaş ve azalmış stroma tabakası oluşturma kapasitesi gösterdiler. Fakat bu değişiklikler *in-vitro* hematopoiezi olumsuz yönde etkilemedi. Daha önceki çalışmalarda kemoterapi veya otolog ve allojeneik kök hücre transplantasyonunun kemik iliği mikroçevresini hasara uğrattığı ve

kemik iliği transplantasyonu sonrası yetersiz hematopoietik recoverye neden olduğu savunulmuştu. Fakat bu araştırmacılar aynı yönde veriler elde etmediler. CD34+117-DR- ve CD34+38+DR- fenotiplerin 5 haftalık LTC-CFC sayıları ile korelasyon gösterdiğini rapor ettiler. Otolog PBSCT'den sonra tam ve kalıcı platelet engraftmanı CD34+117-DR-hücre içeriği ile, uzun dönemli nötrofil ve eritrosit recoveryi ise CD34+38+DR- fenotipi ile ilişkili idi. Yalnız bu hastaların mobilizasyonunda kemoterapi + G-CSF kullanıldığı unutulmamalıdır. Araştırmacılar özellikle düşük sayıda CD34+ hücre ($<3 \times 10^6$ /kg) infüze edildiğinde uzun dönemli engraftmanı kestirmek için 117,38,DR markerlarının ve LTC-CFC'nin önemli ve bakılması gereken kriterler olduğunu iddia ettiler (7).

Fu ve ark. mobilizasyon sonrası toplanmış CD34+ periferik kök hücre kalitesi ile ilgili bir parametre geliştirmek için CFU-GM/CD34+ hücre oranlarını ölçtüler. Bu araştırmacıların vurguladığı gibi çeşitli retrospektif çalışmalar $1-5 \times 10^6$ CD34+ hücre /kg sayısının gerekli olduğunu iddia ettiler. Aslında CD34+ hücrelerin %1 veya daha azı hematopoietik kök hücreleri temsil etmektedir. CFU-GM/CD34+ parametresinin seçilmesi mantığı şöyle kurulmuştur: Mobilize kanda primitif hematopoietik hücrelerin oranı ne kadar yüksek olursa oran düşecektir, çünkü CFU-GM deneyi multipotansiyel hematopoietik progenitörleri göstermemektedir. Allojeneik ya da Otolog PBSCT'ye giren 106 hastadan bu değerlendirme yapıldı. CFU-GM'ler 14.günde değerlendirildi ve eğer koloniler 30 hücreden daha fazla ise skorlandı. CD34+90+38- hücrelerin kemik iliğinin ve dolaşan hematopoietik hücrelerin %0.05 ile %0.1 ini oluşturduğu ve uzun dönemli hematopoietik sistemin yeniden yapılanmasını sağladığı düşünülmektedir. Farklı tipte CD34+ hücre alt gruplarının engraftmanın farklı aşamalarından sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Örneğin CD34+38-90^{low} primitif kök hücreleri, CD34+33+15- erken myeloid hücreleri, CD34+33+15+ geç myeloid hücreleri, CD34+45-71+ geç eritroid hücreleri temsil etmektedir. Sadece CD34+ hücre sayısı ile değil bu alt grupların sayılarının belirlenmesi de engraftman süreleri ve potansiyellerini belirlemede kıymet taşımaktadır. Örneğin lökoferezin 1. gününde CD34+90^{low} hücreler en fazladır ve toplamının takip eden her gününde giderek azalmaktadır. Bu da hematopoietik yeniden yapılanma için yüksek kalitede kök hücre toplamada lökoferez zamanının önemini arttırmaktadır. Ayrıca CD34+33- ve CD34+38- hücre sayıları yine tek başına CD34+ e göre daha kıymetli görünmektedir. Çalışmalarda

preCFU-GM evresindeki CD34+ hücrelerin hızlı platelet engraftmanında daha belirleyici olduğu gösterilmiştir. hematopoietik gelişme hiyerarşisinde megakaryositik serinin myeloid seriden erken dönemde ayrıldığı düşünülürse bu mantıklı görülmektedir. Araştırmacıların çalışmasında CFU-GM/CD34+ oranının transplantasyon sonrası platelet engraftmanı ile ters orantılı olduğu görülmüştür (Oran ne kadar düşükse platelet engraftmanı o kadar hızlı olur). Bu çalışmada oran 0.14'ün altında olduğunda 20000/mm³ üzeri platelete ulaşma zamanı ortalama 20 gün, 0.14'ün üstünde ise ortalama 26 gün bulunmuştur(8).

SONUÇ

Kemik iliğinden ve periferik kandan elde edilen kök hücre ürününün hastaya transplante edildiğinde yeterli olup olmadığı, kalitesinin iyi olup olmadığı, kısa ve uzun dönemli hematopoietik engraftmanı sağlayıp sağlayamayacağı halen hematolojide tartışılmakta olan çok önemli bir konudur. Bu soruların cevapları ürün kaynaklı farklı deneyleri değerlendirerek bulunmaya çalışılmaktadır. En fazla kabul gören iki parametre total CD34+ hücre/kg sayısı ve CFU-GM /kg sayısıdır. Flowsitmetik teknikler CD34+ hücre sayımını kolaylaştırmış ve ISHAGE ve bunun gibi kuruluşların rehberleri ile hemen hemen standardizasyona gitmek mümkün hale gelmiştir. Yukardaki çalışmalarda özetlendiği gibi CD34+ hücre alt gruplarının kök hücre içeriği değerlendirmesindeki kıymetleri konusundaki araştırmalar hızla devam etmektedir. Bunlardan CD34+38- ve CD34+90- veya low hücre alt grupları engraftman açısından daha fazla öne çıkmaktadırlar. CFU-GM ne yazık ki zaman ihtiyacı ve standardizasyonun olanaksız olması sebebiyle halen pratik kullanımda yerini bulamamıştır. Koloni deneylerinin LTC-CFC ve CFU-GMM, CFU-F gibi farklı tipleri de çalışılmakta ve kullanılmakta olmakla beraber henüz CFU-GM derecesinde kabul görmemişlerdir.

TEŞEKKÜR

Bu yazının hazırlanmasında bana destek olan yakın çalışma arkadaşım Dr. Fahri Şahin'e teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Henon PH, Sovalat H, Bourderont D.Importance of CD34+ cell subsets in autologous PBSC transplantation: the mulhouse experience using CD34+CD38-cells as predictive tool for hematopoietic engraftment. J Biol Regul Homeost Agents. 2001 Jan-Mar;15(1):62-7. Review.
2. Wei YQ, Feng R, Yi ZS, et al. Hematopoietic reconstitution in early period after autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2003 Jun;23(6):616-8.
3. Feugier P, Bensoussan D, Girard F, et al. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. Transfusion. 2003 Jul;43(7):878-84.
4. Pratt G, Rawstron AC, English AE, et al. Analysis of CD34+ cell subsets in stem cell harvests can more reliably predict rapidity and durability of engraftment than total CD34+ cell dose, but steady state levels do not correlate with bone marrow reserve. Br J Haematol. 2001 Sep;114(4):937-43.
5. Sumikuma T, Shimazaki C, Inaba T, et al. CD34+/CD90+ cells infused best predict late haematopoietic reconstitution following autologous peripheral blood stem cell transplantation. Br J Haematol. 2002 Apr;117(1):238-44.
6. Kerry Atkinson. Clinical Bone Marrow and Blood stem Cell Transplantation. Cambridge University Press 2000, Second Ed. 204-205.
7. Lanza F, Campioni D, Moretti S, et al. CD34(+) cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Exp Hematol. 2001 Dec;29(12):1484-93.
8. Fu SQ, Abboud CN, Brennan JK, et al. Impact of mobilized blood progenitor cell quality determined by the CFU-GM/CD34+ ratio on rapid engraftment after blood stem cell transplantation. Blood Cells Mol Dis. 2002 May-Jun; 28(3):315-21.